

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-096552
(43)Date of publication of application : 14.04.1989

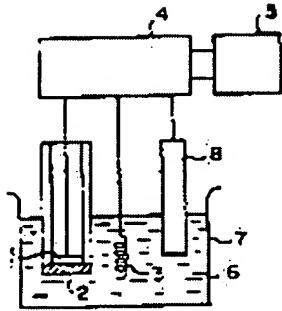
(51)Int.Cl. G01N 27/46

G01N 27/30

(21)Application number : 62-254436 (71)Applicant : ASAHI
BREWERIES
LTD

(22)Date of filing : 07.10.1987 (72)Inventor : KITAGAWA
YASUSHI
KITAHATA
KATSUAKI
KARUBE
MASAO

(54) ETHANOL SENSOR



(57)Abstract:

PURPOSE: To accurately detect ethanol by combining an immobilized film of alcohol dehydrogenase (ADH) which contains an oxidation type acceptor as an electron acceptor and an electrode which oxidizes the electron acceptor reduced by this enzyme.

CONSTITUTION: The immobilized film 2 of the ADH which contains the oxidation type acceptor as the electron acceptor is mounted on the outside surface of a working

electrode 1 such as platinum electrode. This electrode 1 and a counter electrode 3 thereof are connected via respective lead wires to a potentiostat 4, the output of which is sent to a recorder 5. The liquid 6 contg. the electron acceptor which is reduced from the oxidation type to reduction type by the ADH and is oxidized from the reduction type to the oxidation type by the electrode 1 is housed in a measuring cell 7. The electrode 1 and the counter electrode 3 are immersed into this liquid and further, the reference electrode 8 is immersed therein. The concn. of the ethanol is thus known from the relation between the change value of the current flowing to the electrode 1 and the concn. of the ethanol by using a calibration curve.

LEGAL STATUS

[Date of request for
examination]

[Date of sending the examiner's
decision of rejection]

[Kind of final disposal of
application other than the

examiner's decision of
rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for
application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against
examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal
against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許出願公告番号

特公平6-41928

(24) (44)公告日 平成 6 年(1994) 6 月 1 日

| (51)Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|------|----------|----------------|---------|
| G 0 1 N 27/327 | | | | |
| 27/28 | H | 7235-2 J | | |
| 27/416 | | 7235-2 J | G 0 1 N 27/ 30 | 3 5 3 P |
| | | 7235-2 J | | 3 5 3 R |
| 発明の数 1 (全 5 頁) 最終頁に続く | | | | |

| | | | |
|----------|---------------------|----------|---|
| (21)出願番号 | 特願昭62-254436 | (71)出願人 | 999999999 アサヒビール株式会社 東京都中央区京橋 3 丁目 7 番 1 号 |
| (22)出願日 | 昭和62年(1987)10月 7 日 | (72)発明者 | 北川 泰 東京都大田区大森北 2-13-1 朝日麦酒 株式会社中央研究所内 |
| (65)公開番号 | 特開平1-96552 | (72)発明者 | 北畠 克顕 東京都大田区大森北 2-13-1 朝日麦酒 株式会社中央研究所内 |
| (43)公開日 | 平成 1 年(1989) 4 月14日 | (72)発明者 | 軽部 征夫 神奈川県川崎市宮前区有馬2467-11 |
| | | (74)代理人 | 弁理士 佐田 守雄 (外 2 名) |
| | | 審査官 | 嶋矢 督 |
| | | (56)参考文献 | 特開 昭61-281961 (J P, A) 特公 昭61-52949 (J P, B 2) |

(54)【発明の名称】 エタノールセンサー

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】補酵素ピロキノリンキノンを含む細菌由来の精製アルコールデヒドロゲナーゼ固定化膜並びに夫々ポテンシオスタットに接続された酸化電極、対極及び参照電極を酸化還元型電子受容体含有溶液に浸漬してなるエタノールセンサー。

【請求項 2】アルコールデヒドロゲナーゼが酢酸菌の細胞膜からの精製された細胞膜結合性アルコールデヒドロゲナーゼである特許請求の範囲第 1 項記載のエタノールセンサー。

【請求項 3】アルコールデヒドロゲナーゼがメタノール酸化細菌の細胞膜からの精製された細胞膜結合性アルコールデヒドロゲナーゼである特許請求の範囲第 1 項記載のエタノールセンサー。

【請求項 4】アルコールデヒドロゲナーゼの固定化膜が

2

酸化電極の外面に装着されている特許請求の範囲第 1 項記載のエタノールセンサー。

【請求項 5】アルコールデヒドロゲナーゼの固定化膜が酸化電極の近傍に、これと非接触状態に保持されている特許請求の範囲第 1 項又は第 2 項記載のエタノールセンサー。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は溶液中のエタノールを感知してその濃度を測定することができるエタノールセンサーに関する。

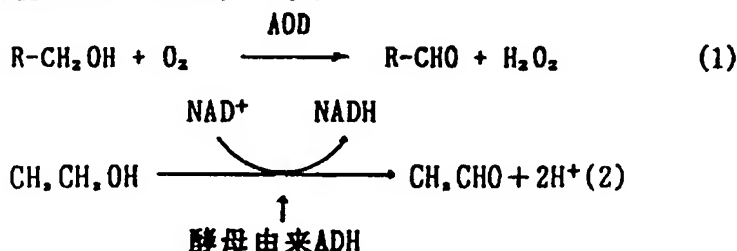
【従来の技術とその問題点】

溶液中のエタノールを感知するセンサーとして、古くは溶液中に浸したガス透過性チューブにキャリアーガスを流し、チューブ内に透過したエタノールを外部の検出器（ガスクロマトグラフィー、赤外線ガス検出器等）で検

10

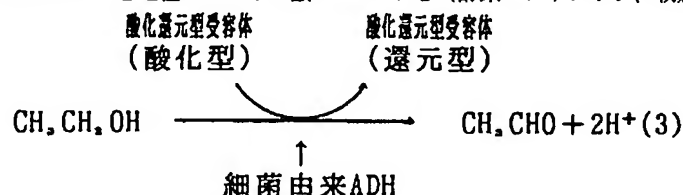
知する装置が知られている(K.Dairaku et al., Biotechnol. Bioeng., 21, 1671(1979)). このものはオンライン計測が可能であり、実際のアルコール発酵液に適用してエタノール測定に使用された例もあるが、装置が大型であるためエタノール測定を簡便に行なえない不都合がある。

これに対して比較的小型のアルコールセンサーとして *



前者は式(1)によって生成した H_2O_2 又は消費された O_2 を H_2O_2 電極又は O_2 電極で測定するセンサーであって、構成が簡単で比較的容易に製作できることから、ワインのエタノール分析に使用された実例もある(M. Mason, Am. J. Enol. Vitic., 34, 173(1983)). しかし、現在使用可能なAODは特異性が低く、メタノールにもエタノールと同様に反応するため、メタノールが共存する溶液中のエタノール測定には使用できない欠点があり、また安定性も約2週間程度と短い。

一方、後者の酵母由来ADHを用いるセンサーは、上記の式(2)によって生成したNADHを電極でNADに酸 *



この酵素はシュードモナス属等の種々のメタノール酸化細菌又は酢酸菌の細胞膜から得られている(O. Adachi et al., Agric. Biol. Chem., 42, 2045(1978), ibid, 42, 2331(1978)). この酵素は補酵素としてピロロキノリンキノン(PQQ)を含む、所謂PQQ酵素であって、補酵素NADを必要としない、広いpH領域で安定である等の特徴を備えている。しかし、グルコースデヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ等の他の酵素も含まれているので、測定溶液にそれらに反応する基質が存在すると的確なる測定が期待できない。

本発明は、酸化還元型電子受容体と、メタノール酸化細菌又は酢酸菌の細胞膜等の細菌由来の酵素を精製した補酵素PQQを含むアルコールデヒドロゲナーゼの固定膜と、この酵素によって還元された酸化還元型電子受容体を酸化する電極を組合わせた、新規エタノールセンサーを提供する。

[問題点を解決するための手段]

本発明は、補酵素ピロロキノリンキノンを含む細菌由来

*は、酵素としてアルコールオキシダーゼ(AOD: EC. 1.1.3.13)を用いたもの(M. Nanjo and G. G. Guilbault, Anal. Chim. Acta, 75, 169(1975))と、酵母由来のアルコールデヒドロゲナーゼ(酵母由来ADH: EC. 1.1.1.1)を用いたもの(T. Yao et al., Anal. Chim. Acta, 139, 363(1978))が開発されている。

※化し、この時流れる電流を測定するものである。このセンサーは前者に比べて特異性が高く、メタノールに反応しない利点があるものの、酸化還元型電子受容体として高価な補酵素NADしか利用できないものであり、この酵母由来のADHを用いるエタノールセンサーは、活性が10日で約70%、20日で約55%まで低下して安定性に欠ける不利点がある。

尤も、ADHには上記の酵母由来のADHとは対照的に、補酵素 NAD^+ を必要とせず次の式(3)に示す反応を行なうADH(EC. 1.1.99.8)があることが知られている(酵素ハンドブック、朝倉書店、p. 71(1982)).

の精製アルコールデヒドロゲナーゼ固定膜並びに夫々ポテンシオスタットに接続された酸化電極、対極及び参照電極を酸化還元型電子受容体含有溶液に浸漬してなるエタノールセンサーである。そして、この酸化電極はアルコールデヒドロゲナーゼによって酸化型から還元型にされた酸化還元型電子受容体を酸化する機能を有し、対極は酸化電極の電位を一定に保ち、かつ、電流が流れるようにする機能を有する。

図面にそって本発明に係るエタノールセンサーの構成をさらに詳しく説明すると、第1図はパッチ式センサーの構成を示し、図示の例では例えば白金電極のような適当な作用電極1の外面に、補酵素ピロロキノリンキノンを含む細菌由来の精製アルコールデヒドロゲナーゼの固定化膜2が装着されている。この作用電極1とその対極3はそれぞれリード線を介してポテンシオスタット4に接続され、ポテンシオスタット4はその出力を記録するための記録計5に接続される。そして、前記のアルコールデヒドロゲナーゼによって酸化型から還元型に還元さ

れ、前記作用電極によって還元型から酸化型に酸化される電子受容体を含有する液6は測定セル7に収容され、この液中に前記した酵素の固定化膜を装着した作用電極1と対極3が没漬され、さらに、参照電極8がこれに浸漬される。

第2図はフロー式センサーの構成を示すものであって、このセンサーは固定化膜2を作用電極1に装着する代わりに、流通式測定セル7の液流入路内に設けて、前記のアルコールデヒドロゲナーゼによって還元された酸化還元型電子受容体が作用電極に到達するようにし、固定化膜2より上流側に試料注入口8を、また流通式測定セル7の液流出路にポンプPを設けた以外は第1図に示すセンサーと同一の構成にある。

本発明のエタノールセンサーで使用する酵素は、酸化型電子受容体の存在下にアルコールをアルデヒドに酸化する能力を備えた酵素であって、この種の酵素としては、メタン及びメタノール酸化性菌に存在するアルコールデヒドロゲナーゼ(EC.1.1.99.8)を精製したもの及び酢酸菌の細胞膜に存在する細胞膜結合性アルコールデヒドロゲナーゼ(membrane-bound ADH)を精製したものがある。なかでも後者は前者に比較して特異性が高く、メタノールに感応することがないので、これを使用すれば、エタノールを選択的に感知するセンサーを製作することができる。本発明で使用する酵素の固定化には、トリアセチルセルロース、1, 8-ジアミノ-4-アミノオクタン、グルタルアルデヒド等を用いた共有結合法(A. Aizawa et al., Anal. Chim. Acta, 115, 61(1980))が採用でき、また軽部等(「ぶんせき」(1987), p. 464)が解説しているような種々の担体結合法、架橋法、包括法によって本発明の酵素を固定化酵素とすることができる。本発明の酸化還元型電子受容体としては、フェリシアン化カリウム($K_3Fe(CN)_6$)のほか、酵素の電子受容体としてよく用いられるフェナジンメトサルフェート(PMS)等のフェナジン誘導体やメルドーラブルー等の酸化還元色素が使用可能である。

作用電極には白金電極、金電極、炭素電極、さらには酸化物電極(酸化インジウム、酸化スズ)等を用いることができ、対極には作用電極より電極表面積が大きい白金電極、金電極、炭素電極、さらには酸化物電極(酸化インジウム、酸化スズ)等を用いることができる。また、参照電極には一般に使用されている銀塩化銀電極又は飽和カロメル電極が使用可能で、参照電極は第1図及び第2図に示すように、電子受容体を含有する液に直接浸漬しても差し支えないが、電子受容体含有液とは分離されたKCl溶液にこれを浸漬し、KCl溶液と電子受容体含有液とを塩橋で接続することが好ましい。

進んで、第1図に示すようなバッチ式センサーを使用して、エタノール濃度を測定する操作を説明する。第1図に示す如く、本発明の酵素の固定化膜を装着した作用電極1、対極3及び参照電極8をそれぞれリード線を介し

てポテンシオスタット4に接続し、さらにこのポテンシオスタットの出力(作用電極に流れる電流の値を示している)を記録計5に接続する。次いで測定セル7に電子受容体を含有する液をセットして、作用電極、対極及び参照電極を液中に浸漬させる。作用電極の電位は参照電極に対して+220mVから+700mVまでの間で選定することができる。ポテンシオスタットの出力が安定したところで、濃度既知のエタノールを含む溶液を測定セルに添加して均一にする。エタノール溶液の添加に伴って出力が変化し、その後再び一定になる。この時の出力の変化値(作用電極に流れる電流の変化値 ΔI)を求める。測定セル内の溶液を交換して上と同様な操作を繰り返すことにより、エタノール濃度と ΔI との関係を示す検量線をまず作成する。次に濃度未知のエタノールを含む試料液について、上と同様な操作を行なってその場合の ΔI を求め、その値に対応するエタノール濃度を先に作成した検量線から読み取ることにより、試料液のエタノール濃度を知ることができる。

本発明のエタノールセンサーに使用されるアルコールデヒドロゲナーゼは極めて安定であって、その活性は10日で約98%、30日で約80%に低下するに過ぎない。

[実施例]

(1) 酢酸菌由来のアルコールデヒドロゲナーゼの精製と固定化

O. Adachi et al.の方法(Agric. Biol. Chem., 42, 2045(1978))に従って、酢酸菌の一種であるグルコンバクターサブキシダンス(*Gluconobacter suboxydans*) IFO 3172から、細胞膜結合性アルコールデヒドロゲナーゼを精製した。そして、この酵素をAizawa et al.の方法(Anal. Chim. Acta, 115, 61(1980))で固定化した。

(2) エタノールセンサーの製作

上記のようにして得られた固定化酵素膜を白金電極上に装着し、その周囲を透析膜で保護して作用電極とした。対極には長さ10mm、直径1mmの白金線をコイル状に巻いた白金コイル電極を用い、参照電極には銀塩化銀電極(TOA HS-907)を使用した。測定セルとしては二重ピーカーを使用し、この中に9.9mlの電子受容体含有液を入れ、これに作用電極と対極を没漬させ、恒温30℃に保持した。参照電極は1MのKCl溶液を入れた別のセルに挿入し、測定セルと塩橋をつないだ。電子受容体含有液としては、10ml $K_3Fe(CN)_6$ 、0.1% Triton X-100を含むマッキルベイン(McIlvaine)緩衝液(pH5.5)を用いた。上記の作用電極、対極及び参照電極をそれぞれリード線を介してポテンシオスタット(HOKUTU HA-501)に接続し、ポテンシオスタットの出力は記録計(理化電機工業(株)HR-2308)に接続した。作用電極の電位は銀塩化銀電極に対して+350mVに設定した。

(3) エタノール濃度の検量線の作成

まず、(2)で作成したエタノールセンサーの出力(作用電極に流れる電流 I を示す)が安定したところで電流値

I_0 を測定し、次に濃度既知のエタノール溶液 $100\mu\text{L}$ を測定セル内の酸化還元型電子受容体含有液に添加して均一になるよう攪拌する。エタノール溶液の添加と共に出力が変化し、数分後に再び定常状態になると出力が安定するので、この時の電流値 I_s を測定し、 I_0 と I_s との差を ΔI を算出する。次に測定セル内の液を排除し、新しい酸化還元型電子受容体含有液を上と同様に測定セルに入れて電流値 I_0 を測定後、濃度既知ではあるが、上の場合とエタノール濃度が異なるエタノール溶液を注加して ΔI を求める操作を繰り返して第3図に示す検量線を得た。

(4) ビール中のエタノール濃度の測定

上記の(2)で製作したエタノールセンサーと、(3)で作成した検量線を用いて、ビール中のエタノール濃度を測定した。また、比較のため、同じ試料液(ビール)について市販のビール自動分析機(SCABA, Serbo Chem社製)を使用してエタノール濃度を測定した。結果を次表に示す。

| 試料 | エタノール濃度[W/W%] | |
|------|---------------|-------|
| | エタノールセンサー | SCABA |
| ビールa | 3.98 | 4.03 |
| ビールb | 3.82 | 3.83 |
| ビールc | 3.93 | 3.76 |

20

上表から明らかな通り、本発明のエタノールセンサーに*

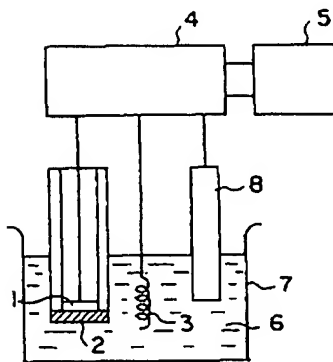
*による測定値は、SCABAの分析値と良く一致し、このセンサーはビール中のエタノールの測定に使用できることが分かる。

【図面の簡単な説明】

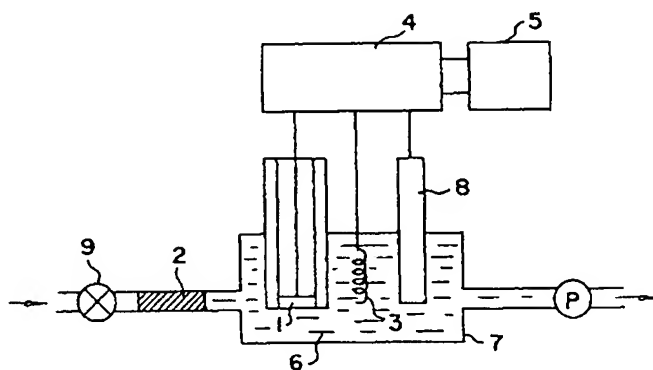
第1図及び第2図はそれぞれ本発明のエタノールセンサーの構成を示す断面図であり、第3図は本発明のエタノールセンサーを用いてエタノールを測定する場合の検量線の一例を示す。

1：作用電極、2：酵素固定化膜、3：対極、4：ポテンシオスタット、5：記録計、6：電子受容体含有液、7：測定セル、8：参照電極、9：試料注入口

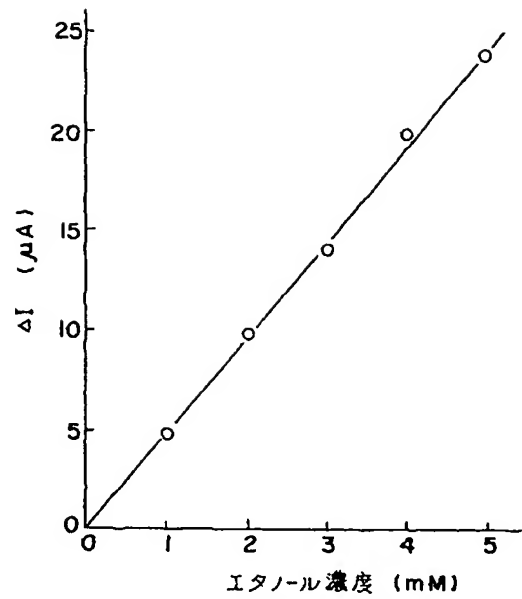
【第1図】



【第2図】



【第3図】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.³

識別記号

庁内整理番号
7235-2J

F I

G 0 1 N 27/46

技術表示箇所

3 0 1 G